



**University of
Zurich**^{UZH}

**Zurich Open Repository and
Archive**

University of Zurich
University Library
Strickhofstrasse 39
CH-8057 Zurich
www.zora.uzh.ch

Year: 2004

SHCS und die Labordiagnostik der HIV-Infektion - von der Entwicklung des HIV Western Blot über die Virusquantifizierung zur klinisch relevanten individuellen Viruscharakterisierung

Schüpbach, J

Abstract: The first reliable diagnostic tools for the diagnosis of HIV infection, Western blot and ELISA, were created 20 years ago in the U.S., using initially sera from AIDS patients diagnosed clinically in Switzerland. In Swiss laboratories the diagnosis of HIV infection today is established by using 4th generation screening tests which detect both antibodies and p24 antigen while in the doctor's surgery a rapid antibody assay is used. Confirmation in authorized confirmatory labs relies on a set of different minimal combinations of positive test results derived from both the first and second blood specimen. In patients with a confirmed diagnosis of HIV infection, two further principal questions arise concerning, on the one hand, the virus load and, on the other hand, some clinically relevant properties of the infecting virus (type or subtype, resistance against antiretroviral drugs). The paper starts with a personal flashback to the first days of HIV diagnostics and describes the sensible use of tests available today for answering the above-mentioned principal questions. Alternative methods which can be used when standard tests fail or appear unreliable are mentioned also.

DOI: <https://doi.org/10.1024/0040-5930.61.10.603>

Other titles: SHCS and the laboratory diagnosis of HIV infection—from the development of the HIV Western blot to virus quantification and clinically relevant individual virus characterization

Posted at the Zurich Open Repository and Archive, University of Zurich

ZORA URL: <https://doi.org/10.5167/uzh-2143>

Journal Article

Published Version

Originally published at:

Schüpbach, J (2004). SHCS und die Labordiagnostik der HIV-Infektion - von der Entwicklung des HIV Western Blot über die Virusquantifizierung zur klinisch relevanten individuellen Viruscharakterisierung. *Therapeutische Umschau*, 61(10):603-607.

DOI: <https://doi.org/10.1024/0040-5930.61.10.603>

Nationales Zentrum für Retroviren, Universität Zürich, Zürich

SHCS und die Labor- diagnostik der HIV-Infektion – von der Entwicklung des HIV Western Blot über die Virus- quantifizierung zur klinisch relevanten individuellen Viruscharakterisierung

J. Schüpbach

Zusammenfassung

Die diagnostischen Instrumente für die Beantwortung der primären Frage der HIV-Labordiagnostik – ist jemand mit HIV infiziert? – wurden vor 20 Jahren mit Hilfe von Seren der ersten PatientInnen mit AIDS in der Schweiz geschaffen: Western Blot und ELISA. Der heutigen HIV-Diagnostik in der Schweiz stehen für das Screening in den klinischen Labors die vierte ELISA-Generation (Combo-Tests für Antikörper und Antigen) und in den Arztpraxen ein Schnelltest zur Verfügung. Für die Bestätigungslaboratorien steht eine Auswahl von Minimalkombinationen positiver Testresultate aus der ersten und zweiten Blutprobe zur Verfügung, welche die Diagnose einer HIV-Infektion klar bestätigen. Bei PatientInnen mit bestätigter HIV-Infektion stellen sich sofort zwei weitere zentrale Fragen, nämlich nach der Viruslast und nach klinisch relevanten spezifischen Viruseigenschaften (HIV-1 oder HIV-2, HIV-1 Subtyp, Resistenz

gegen antiretrovirale Medikamente). Der Beitrag enthält einen kurzen persönlichen Rückblick auf die ersten Tage der HIV-Diagnostik und nennt die Testsysteme, die heute für die Beantwortung der drei Kardinalfragen standardmäßig eingesetzt werden. Erwähnt sind auch Alternativmethoden, die bei Versagen der Standardmethoden benützt werden können.

20 Jahre HIV-Diagnostik – sie begann mit Schweizer Seren!

Wenigen ist heute noch bekannt, dass es Seren der ersten schweizerischen AIDS-PatientInnen waren, mit welchen die diagnostischen Tests für HIV entwickelt wurden. Als *Visiting Fellow* im Labor von Robert C. Gallo am NIH hatte ich auf der Western Blot (WB) Basis ein serologisches System zur Identifizierung von Virus-Antigenen entwickelt. In Zusammenarbeit mit Mika Popovic begann ich im Sommer 1983, dieses System für die Identifizierung des AIDS-Virus einzusetzen. Mika lieferte mir dabei das AIDS-spezifische Antigen-System, indem er das AIDS-Virus in Zellkulturen von AIDS-Patienten zur Vermehrung brachte. Lysate von viruspositiven Kulturen sowie von virusnegativen Kontrollkulturen übergab er mir zur vergleichenden serologischen

Analyse. Mit den Lysaten stellte ich WB-Streifen her und ließ sie einerseits mit Seren von AIDS-Patienten und, zum Vergleich, mit Seren von gesunden Blutspendern reagieren. So identifizierten wir spezifische Antigenbanden im WB, welche nur bei virus-positiven AIDS-Kulturen vorkamen und gegen welche nur die AIDS-Patienten Antikörper hatten. Die Seren für die ersten Experimente stammten alle aus der Schweiz. Schweizer Infektiologen hatten sie mir in Milliliter-Quantitäten überlassen, nachdem ich ihnen erzählt hatte, dass es mir im Gallo-Labor nicht möglich war, mehr als 100 Mikroliter dieses heiß umkämpften Untersuchungsmaterials zu erlangen. Bereits das erste Experiment, Mitte Januar 1984 durchgeführt, zeigte nach drei Tagen als Resultat eine eindeutige und spezifische serologische Assoziation des in den Zellkulturen isolierten Retrovirus mit AIDS, identifizierte die wesentlichen viralen Antigene und etablierte die dabei verwendete Methode, den WB, als den ersten Test, mit welchem AIDS-Patienten und noch asymptomatische Virus-Träger zuverlässig identifiziert werden konnten [1]. Nach der

darauf rasch realisierten Entwicklung eines Screeningtests auf ELISA-Basis [2] wandelte sich der aufwändigere WB zu einem Bestätigungstest [3], der auch heute noch, 20 Jahre danach, einen festen Platz in der HIV-Diagnostik hat. Dank der personellen Verbindung ins Gallo-Labor hatten schweizerische PatientInnen mit AIDS oder Vorstufen von AIDS stets bevorzugten Zugang zu der sich rasch etablierenden HIV-Diagnostik. Epidemiologische Studien zeigten schon bald eine hohe Prävalenz des Virus bei Personen mit Risikoverhalten in der Schweiz [4]. Ging es vor 20 Jahren ausschließlich um die Abklärung, ob jemand HIV-infiziert war (Frage 1), hat sich das Spektrum der Probleme, mit denen das HIV-Labor konfrontiert ist, seither um zwei weitere Kardinalfragen erweitert. Bei PatientInnen, bei denen die Diagnose einer HIV-Infektion bereits klar etabliert ist, stellt sich sofort eine zweite Frage, nämlich die nach der Aktivität der Infektion, das heißt nach der Viruslast (viral load; VL). Dieser Parameter wird zusammen mit der CD4-Zahl zur Abschätzung der Prognose und für die Therapieüberwachung benötigt.

Tabelle 1 Übersicht über die drei prinzipiellen Fragestellungen der HIV-Diagnostik und die für ihre Beantwortung eingesetzten Tests

1. Ist jemand mit HIV infiziert?

Screening-Stufe	Bestätigungsstufe	
Erstmaterial (Serum oder Plasma)	im Erstmaterial einsetzbare Tests	im Zweitmaterial (7–10 ml EDTA- Blut) einsetzbare Tests
<ul style="list-style-type: none"> • In Labors: Test der 4. Generation (Combotest; erfasst Antikörper und p24 Ag) • In Arztpraxen: Schnelltest (erfasst nur Antikörper) 	<ul style="list-style-type: none"> • Zweiter ELISA • Schnelltest • Western Blot • Line Immunoassay • p24 Ag + Neutralisation 	<ul style="list-style-type: none"> • Zweiter ELISA • Schnelltest • Western Blot • Line Immunoassay • p24 Ag + Neutralisation • Roche HIV-1 Monitor™ • PCR für HIV-1 RNA (qualitativ) • PCR für HIV-1 DNA (qualitativ) • PCR für HIV-2 DNA (qualitativ) • MEGA-PCR für HIV-1 DNA

2. Wie hoch ist die Viruslast?

Primär eingesetzte Tests	Alternative Tests	
<ul style="list-style-type: none"> • HIV-1 RNA mit HIV-1 Monitor™ → Konzentration der HIV-1 Viruspartikel im Plasma 	<ul style="list-style-type: none"> • RT-Aktivität mit PERT Assay → Konzentration der HIV-1 oder HIV-2 Viruspartikel im Plasma 	<ul style="list-style-type: none"> • hitzedenaturiertes p24 Ag → Konzentration von HIV-1 p24 Ag innerhalb und vor allem auch außerhalb von Viruspartikeln im Plasma

3. Welche Eigenschaften hat das Virus?

Ist es HIV-1 oder HIV-2?	Hat es Resistenzen gegen antiretrovirale Medikamente?	Zu welchem HIV-1 Subtypen gehört es?
<ul style="list-style-type: none"> • Western Blot • Line Immunoassay • HIV-1/2 Schnelltest • DNA-PCR für HIV-1 bzw. HIV-2 	<ul style="list-style-type: none"> • Genetischer Resistenztest • Phänotypischer Resistenztest 	(Nebenresultat des genetischen Resistenztests)

Außerdem stellt sich heute auch vermehrt eine dritte Frage, nämlich nach besonderen Eigenschaften des Virus eines individuellen Patienten: Um welchen Subtyp einer HIV-Infektion handelt es sich, oder ist das Virus gegen gewisse HIV-Medikamente resistent. Tabelle 1 gibt einen Überblick über heute eingesetzte Tests.

Frage 1: Ist jemand mit HIV infiziert?

Für diese primäre und zentrale Fragestellung sind direkte und indirekte Tests zu unterscheiden. Die indirekten Tests beruhen auf der (humoralen) Immunantwort eines Infizierten. Direkte Tests weisen Viruskomponenten nach, zum Beispiel Virusproteine, Virusenzyme oder virale Gensequenzen.

Für das HIV-Screening empfiehlt das Schweizerische HIV-Testkonzept den klinischen Laboratorien seit dem 1. März 2004 einen Test der vierten Generation, einen sog. Combo-Test [9]. Ein solcher Test weist nicht nur Antikörper, sondern auch ein Virusprotein (p24 Antigen) nach, wodurch die Empfindlichkeit während der HIV-Primoinfektion deutlich verbessert wird. In den Arztpraxen kann weiterhin der Antikörper-Schnelltest (HIV-Determine) eingesetzt werden, welcher die schon etwas länger dauernden Infektionen (> 3 Monate nach Exposition) ebenso gut erfasst wie ein Combo-Test. Das p24 Ag ist nur zu Beginn der Primoinfektion empfindlicher. Bei klinischem Verdacht auf eine Primoinfektion muss die Probe also unbedingt in ein Labor gesandt werden, damit das p24 Ag erfasst wird (siehe Beitrag über die HIV-Primoinfektion von M. Battegay in diesem Heft).

Den Bestätigungslaboratorien stehen heute neben dem WB weitere Tests zur Verfügung. Für eine Bestätigung sind heute bestimmte Minimalkombinationen positiver Resultate verschiedener Tests im Erst- und Zweitmaterial notwendig, wie sie im Laborkonzept von 1998 definiert wurden [6]. Bestätigende Minimalkombinationen sind beispielsweise (i) ein reaktiver Combostest im Erstmaterial *und* ein positiver WB im Zweitmaterial oder (ii) ein reaktiver Combostest *und* ein reaktiver zweiter Screeningtest im Erstmaterial *und* Viruslast (VL) > 1000 HIV-1 RNA Kopien/mL im Zweitmaterial. Der Entscheid darüber, welche Kombination herangezogen wird, obliegt dem Bestätigungslabor.

Unweigerlich führen diese Testalgorithmen gelegentlich auch zu vorerst unklaren Situationen. Was, wenn zwei verschiedene Screeningtests im Erstmaterial positiv waren (was ein starkes Indiz für eine HIV-Infektion darstellt), die VL im Zweitmaterial aber nicht nachweisbar oder nur niedrig ist? In diesem Fall liegt kein bestätigt positives Resultat vor, und man wird weitere Tests einsetzen müssen. Insbesondere muss die sehr viel seltenere HIV-2 Infektion gesucht werden (HIV-2 wird im Standardverfahren für VL nicht oder nur suboptimal nachgewiesen). Die

Differenzierung von HIV-1 und HIV-2 erfolgt im Nationalen Zentrum für Retroviren (NZR).

Gelegentlich kann trotz starkem Verdacht auf eine HIV-1 Infektion, zum Beispiel nach langdauernder ungeschützter Exposition durch einen bekannt HIV-1-positiven Partner, ein im Screeningtest wiederholt reaktives Resultat mit kommerziell erhältlichen Tests (inklusive HIV-1 Monitor™) nicht zweifelsfrei bestätigt werden. Für solche Fälle, in denen – falls überhaupt eine Infektion vorliegt – eine extrem niedrige Konzentration HIV-infizierter Zellen vermutet werden muss, hat das Nationale Zentrum für Retroviren (NZR) eine ultrasensitive diagnostische PCR, die MEGA-PCR entwickelt. Diese untersucht sehr große DNA-Proben (bis 500 µg anstelle von normalerweise 1–2 µg). Damit wird die Empfindlichkeit entsprechend um mehr als das Hundertfache gesteigert. Der Test ist ideal für die Abklärung von Personen mit persistent reaktivem Screening-Resultat, bei welchen der WB mit einer frühen Infektion vereinbar ist, es aber nicht zu einer vollständigen Serokonversion kommt [7].

Frage 2: Wie hoch ist die Viruslast?

Diese Frage ist wichtig für die individuelle Abschätzung der Prognose eines Patienten und, falls eine ART durchgeführt wird, für die Kontrolle der Wirksamkeit derselben. Die Viruslast (VL) wird durch die Messung der Konzentration von definierten Viruskomponenten im Plasma bestimmt. In den letzten Jahren fest eingebürgert hat sich die quantitative Bestimmung der HIV-1 RNA im Plasma mittels RNA-PCR (HIV-Monitor™). Meist wird ein ultrasensitives Verfahren mit einer unteren Quantifizierungsgrenze von 50 Kopien/mL eingesetzt. Es war die Gruppe von Luc Perin am Kohortenzentrum Genf, welche diese ultrasensitive Methode ursprünglich entwickelte [8].

Trotz der allgemein guten Empfindlichkeit gegenüber Gruppe M-Viren gibt es auch bei solchen gelegentlich ein Virus, dessen Sequenz vom HIV-1 Monitor™ schlecht erkannt wird. Bei der Kombination «niedrige oder abnehmende CD4-Zellzahl trotz stets niedriger VL» sind daher Zweifel an der Gültigkeit des niedrigen VL-Resultats angebracht. Da die VL alternativ auch sequenzunabhängig durch Messung der in den HIV-Partikeln eingeschlossenen Reversen Transkriptase mit einem ebenfalls ultrasensitiven Test bestimmt werden kann, sollte in solchen Fällen der am NZR entwickelte sog. PERT-Assay (Product-Enhanced Reverse Transcriptase) durchgeführt werden [9].

Ein weiteres alternatives Verfahren, welches ebenfalls am NZR entwickelt wurde, ist die ultrasensitive p24 Bestimmung. Diese Methode wurde mit HIV-1 Monitor™ in zahlreichen Studien verglichen und ist in ihrer Leistung in vielerlei Hinsicht mit diesem vergleichbar. Der Test hat, neben dem HIV-1 Monitor™,

einen festen Platz in der Diagnostik pädiatrischer HIV-1 Infektionen. Bei erwachsenen Patienten wird er bisher nicht in der Routine eingesetzt. Dank der kostengünstigen Durchführung bietet sich der p24 Ag Test in Entwicklungsländern als Alternative zur PCR an.

Frage 3: Welche Eigenschaften hat das Virus?

Die Abklärung bestimmter genetischer oder biologischer Eigenschaften des Virus kann für die Überwachung der Infektion oder die Zusammensetzung der ART von großer Bedeutung sein. Einfachstes Beispiel ist die Differenzierung zwischen HIV-1 oder HIV-2, die schon unter Frage 1 kurz erwähnt wurde. Ein Verdacht auf eine HIV-2 Infektion besteht bei Personen mit epidemiologischer Verbindung nach Westafrika (Guinea-Bissau) oder dem mit dieser Region früher kolonial verbundenen Portugal.

Für die Klinik ist die wichtigste Frage, ob das Virus eines Patienten individuelle Resistenzen gegen antiretrovirale Medikamente aufweist (s. Beitrag über Adherence und Resistenz von T. Klimkait und P. Vernazza in diesem Heft). Die Resistenztestung ist indiziert bei (i) der HIV-1 Primoinfektion, (ii) vor Therapiebeginn bei einer nach 1997 infizierten Person (d.h. bei der überwiegenden Mehrheit der PatientInnen, bei denen heute eine Ersttherapie indiziert ist), (iii) vor einer Salvage-Therapie oder vor einer anders begründeten Therapieumstellung, (iv) in der Schwangerschaft vor Beginn der antiretroviralen Prophylaxe, (v) bei einem Kind, welches trotz antiretroviraler Prophylaxe infiziert wurde und (vi) beim Indexpatienten bei einer Post-Expositions-Prophylaxe. Indikationen (i) – (iii) und (vi) gelten selbstverständlich nicht nur für Erwachsene, sondern auch für HIV-infizierte Kinder.

Die Resistenztestung wird meist als genetische Resistenztestung durchgeführt. Mittels Sequenzierung der relevanten HIV-Genomabschnitte wird nach Mutationen gesucht, die mit einer Resistenz gegen ein oder mehrere Medikamente assoziiert sind. Mittels computergestützten Algorithmen wird die zu erwartende Wirksamkeit der verschiedenen gebräuchlichen antiretroviralen Medikamente berechnet. Bei der phänotypischen Resistenztestung wird dagegen, ähnlich wie bei der bakteriellen Resistenzprüfung, in vitro direkt untersucht, ob und wie stark die Vermehrung des Patientenvirus in der Anwesenheit individuell zugegebener antiretroviraler Medikamente im Vergleich zum Virus-Wildtyp gehemmt wird. Eine empfindliche Methode für die phänotypische Resistenztestung wurde von T. Klimkait in Basel entwickelt.

Bei der genetischen Resistenztestung wird gleichzeitig auch der HIV-1 Subtyp ermittelt. Die HIV-Sequenzinformation ermöglicht auch molekulare epi-

demologische Untersuchungen. Die Sequenzdaten werden im Rahmen der Schweizerischen HIV-Resistenzstudie seit 2003 in einem zentralen Internet-gestützten anonymisierten Datenregister erfasst. Für SHCS-PatientInnen werden die Daten automatisch in der SHCS-Datenbank deponiert. Im ersten Studienjahr (2003) erfolgten 1100–1200 Einträge. Bei einem rasch größer werdenden Teil der SHCS-PatientInnen wird so künftig auch der HIV-Subtyp und die individuelle molekulare Identität der Viren in die Forschung einbezogen werden können.

Schlussbemerkungen

Ich habe hier versucht, die HIV-Diagnostik gemäß drei einfachen prinzipiellen Fragen darzustellen. Ausgehend von diesen prinzipiellen Fragen müssen häufig untergeordnete, spezifischere Fragen abgeleitet werden. Beim Untersuchungsauftrag an das Labor muss der Arzt genau wissen, was er wissen will, und er muss es dem Labor mit einer angemessenen Präzision – aber auch nicht zu eng! – mitteilen. Der vorliegende Beitrag möge ihm dabei helfen.

Die heutige HIV-Routinediagnostik ist in wesentlichen Teilen aus schweizerischen Forschungsergebnissen entstanden. Klinik, Diagnostik und Forschung müssen, zum Wohl der Patienten, eng zusammenarbeiten. Die Integration von Klinikern und Laborärzten ist ein wichtiges Ziel der SHCS.

Literatur

1. Schupbach J, Popovic M, Gilden RV, Gonda MA, Sarnadharan MG, Gallo RC. Serological analysis of a subgroup of human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) associated with AIDS. *Science* 1984; 224: 503–5.
2. Sarnadharan MG, Popovic M, Bruch L, Schupbach J, Gallo RC. Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. *Science* 1984; 224: 506–8.
3. Schupbach J, Haller O, Vogt M, et al. Antibodies to HTLV-III in Swiss patients with AIDS and pre-AIDS and in groups at risk for AIDS. *N Engl J Med* 1985; 312: 265–70.
4. Schupbach J, Vogt M, Bhushan R, et al. [Prevalence of antibodies against HTLV-III in various regions in Switzerland]. *Schweiz Med Wochenschr* 1985; 115: 1048–54.
5. HIV-Testkonzept 2004. Neue Richtlinien zum Screening. *BAG Bulletin* 2004: 168–70.
6. HIV-Testkonzept 1998. Neue Richtlinien. *BAG Bulletin* 1998: 7–10.
7. Boni J, Shah C, Flepp M, Luthy R, Schupbach J. Detection of low copy numbers of HIV-1 proviral DNA in patient PBMCs by a high-input, sequence-capture PCR (Mega-PCR). *J Med Virol* 2004; 72: 1–9.
8. Schockmel GA, Yerly S, Perrin L. Detection of low HIV-1 RNA levels in plasma. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; 14: 179–83.
9. Pyra H, Boni J, Schupbach J. Ultrasensitive retrovirus detection by a reverse transcriptase assay based on product enhancement. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1544–8.

Summary: SHCS and the laboratory diagnosis of HIV infection – from the development of the HIV Western blot to virus quantification and clinically relevant individual virus characterization

The first reliable diagnostic tools for the diagnosis of HIV infection, Western blot and ELISA, were created 20 years ago in the U.S., using initially sera from AIDS patients diagnosed clinically in Switzerland. In Swiss laboratories the diagnosis of HIV infection today is established by using 4th generation screening tests which detect both antibodies and p24 antigen while in the doctor's surgery a rapid antibody assay

is used. Confirmation in authorized confirmatory labs relies on a set of different minimal combinations of positive test results derived from both the first and second blood specimen. In patients with a confirmed diagnosis of HIV infection, two further principal questions arise concerning, on the one hand, the virus load and, on the other hand, some clinically relevant properties of the infecting virus (type or subtype, resistance against antiretroviral drugs). The paper starts with a personal flashback to the first days of HIV diagnostics and describes the sensible use of tests available today for answering the above-mentioned principal questions. Alternative methods which can be used when standard tests fail or appear unreliable are mentioned also.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. med. Jörg Schüpbach, Nationales Zentrum für Retroviren, Universität Zürich, Goriastraße 30, CH-8028 Zürich